

## OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES FERMENTATIVAS PARA LA PRODUCCION Y EXTRACCION DE $\beta$ -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus*

G. GAMARRA - BALLENA\*, J. C. WOOLCOTT-HURTADO\*\*

\*Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Jr. Puno 1002. Lima - Perú

\*\*Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Facultad de Química e Ingeniería Química  
Av. Venezuela s/n Lima-Perú

**Abstract :** Five strains of *Kluyveromyces marxianus* a one of *Candida pseudotropicalis* were cultured in medium M-I for producción of  $\beta$ -galactosidase (E.C: 3:2:1:23). The strain *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y - 1109 was selected for the best production ( 11.6 U/ml). The maximum yield of enzyme (1330 U<sub>ONPG/g</sub> of biomass) was obtained on 5% of lactose supplemented with 0.5% yeast extract , 0.75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> y 0.45% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (w/v). The best extraction of the enzyme from viable cells was performed by toluene 2% (v/v), at pH 7.0  $\pm$  0.1, 30°C during 15 hours of treatment, in 0.1 M potassium phosphate buffer, supplemented with 1 mM magnesium and 0.1 mM manganese sulfate. The enzyme was partially purified with acetone. It obtained a specific activity of de 73 U<sub>LACTOSA/mg</sub> of protein and a yield of 93.3%. Optimun pH and temperature for enzyme activity were pH 6.6 and 40°C. The K<sub>m</sub> for lactose was 15 mM and V<sub>m</sub> of 7.3 x 10<sup>5</sup> M/min.

**Key words:** Enzyme, lactase,  $\beta$ -galactosidase

**Resumen :** Cinco cepas de levadura de *Kluyveromyces marxianus* y una cepa de *Candida pseudotropicalis* fueron cultivadas en medio M -I, para la producción de  $\beta$ - galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). La cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL- Y - 1109 fue seleccionada por obtenerse mayor producción de la enzima ( 11.6 U/ml) El máximo rendimiento de la enzima ( 1330 U<sub>ONPG/g</sub> de biomasa) fue obtenida con 5% de lactosa suplementado con extracto de levadura 0.5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.75% y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.45% (p/v), Las mejores condiciones de extracción de la enzima a partir de células viables se realizó con tolueno 2% (v/v), a pH 7.0  $\pm$  0.1, 30°C, durante 15 horas de tratamiento en tampón fosfato de potasio 0.1 M, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso. La enzima fue parcialmente purificada con acetona, obteniéndose una actividad específica de 73 U<sub>LACTOSA/mg</sub> de proteína y un rendimiento de 93.3%. La temperatura de 40°C y el pH de 6.6 resultaron óptimos para la actividad enzimática. El K<sub>m</sub> para lactosa fue de 15 mM y V<sub>m</sub> de 7.3 x 10<sup>5</sup> M/min.

**Palabras clave:** Enzima, Lactasa.  $\beta$ -galactosidasa.

### INTRODUCCION

La leche contiene el 4.8% de lactosa. Este carbohidrato es poco soluble y con baja capacidad edulcorante. Estos inconvenientes han limitado su uso en alimentos como helados, confites y alimento para animales. Así como, también han limitado el uso del suero lácteo por su alto contenido de lactosa y constituye un severo problema de contaminación(22)

Se han planteado diversas alternativas para la utilización de la lactosa del suero lácteo desproteinizado. Estos estudios han sido dirigidos principalmente a la producción de biomasa celular, etanol y  $\beta$ -galactosidasa (2, 6, 24).

La hidrólisis enzimática de la lactosa ha sido sugerido como un medio de reducir su contenido en leche y productos lácteos (3).

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica con un alto grado de especificidad y eficiencia, lográndose acelerar los procesos químicos en una magnitud de hasta 10<sup>15</sup> veces (30), debido a la acción concertada de más de un grupo químico de la proteína en la catálisis, disminuyendo la energía libre de activación.

Así su aplicación se lleva a cabo en condiciones medias de pH y temperatura, las reacciones enzimáticas se llevan a cabo a temperaturas de 25 a 60°C y a valores de pH 5.0 a 8.0.

La lactasa  $\beta$ -D-galactosidogalactohidrolasa (E.C. 3.2.1.23), es la enzima responsable de la hidrólisis de la lactosa en galactosa y glucosa teniendo este último más poder edulcorante que la lactosa (4). Esta en-

zima se usa desde hace años en la preparación de productos deslactosados a base de leche y suero (15).

El tratamiento enzimático mejora los problemas de insolubilidad y de baja dulzura del producto(4). Asimismo mejora la capacidad nutricional de la leche(29) y de incrementar la utilización del suero lácteo del queso (18, 31).

Las levaduras lactosa fermentativas, tales como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida pseudotropicalis* y los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, son las principales fuentes de enzima y las más usadas comúnmente para su preparación(32).

Los factores que afectan la biosíntesis de la lactasa ( medio de cultivo, pH, temperatura, aereación, agitación) de *Kluyveromyces fragilis* ( sinónimo de *Kluyveromyces marxianus*) han sido reportados(1, 7, 10, 14, 22, 29).

El presente estudio pretende diseñar un proceso optimizado para la producción y extracción de  $\beta$ -galactosidasa a partir de cinco cepas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y- 1109, 1207, 1151, 1175 y 1196 y una cepa de *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329, en medios químicamente formulados. Se determinará algunas propiedades de la enzima.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismos y medio de mantenimiento.

Se utilizaron 6 cepas de levaduras con capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono: 5 cepas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, 1175, 1151, 1207, 1196 y una cepa de *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329, procedentes de la Northern Regional Research Laboratory (NRRL), pertenecientes a la colección de levaduras del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las levaduras fueron mantenidas en Agar inclinado YPL(25) con la siguiente composición: Lactosa 1%; Peptona de caseína 1%; Extracto de levadura 0.3% y Agar 1.5% (Sigma y Merck), y conservados a 4°C, transferidos mensualmente y verificados en su pureza.

Selección de cepas de levaduras con potencial de producción de  $\beta$ -galactosidasa. Los inóculos fueron preparados en matraces de 500

ml con 50 ml de caldo YPL con la siguiente composición: Lactosa 2%; Extracto de levadura 0.3%, Peptona de caseína 1%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5% y  $\text{MgSO}_4$  0.05%. a pH 5.5 e incubados a 30°C por 15 horas. Matraces de un litro con 90 ml de caldo Y.P.L fueron inóculados con 10% (v/v) del caldo Y.P.L e incubados a 30°C con agitación constante (150 strokes/minuto). La pureza de los inóculos se verificó por microscopía.

La actividad hidrolítica de la lactasa de las levaduras fue determinada en medio M-I (14); con la siguiente composición: Lactosa 5%; Extracto de levadura 0.75%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.84%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.45% y  $\text{MgSO}_4$  0.05%. Matraces de un litro con 90 ml del medio M-I, a pH 5.5 fueron inóculados con 10% (v/v) del caldo Y.P.L e incubados a 30°C por 12 horas con agitación constante (150 strokes/minuto).

### Optimización de la producción de $\beta$ -galactosidasa sobre medio químicamente formulado.

Se siguió el diseño factorial propuesto por Chen (8) que permitió evaluar la influencia de la lactosa, extracto de levadura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , sobre la producción de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109. Los parámetros de fermentación fueron: pH 5.5, temperatura 30°C, agitación 150 strokes/min. El volumen de ensayo fue de 90 ml en matraces de un litro, con 10% v/v de inóculo.

El inóculo se preparó a partir de la cepa mantenidas en agar inclinado YPL, la cual fue transferida a matraces de 500 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo con la siguiente composición: lactosa 2%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.84%, extracto de levadura 0.75%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.45% y  $\text{MgSO}_4$  0.05%.

Los factores evaluados se distribuyeron aleatoriamente, siguiendo el diseño factorial propuesto.

El diseño factorial aplicado comprende 3 niveles siendo estos: concentración de lactosa 25.0, 50.0 y 75.0 g/l; concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5.0, 7.5 y 10.0 g/l; concentración de extracto de levadura 2.5, 5.0 y 7.5 g/l; concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.0, 4.5 y 6.0 g/l.

**Extracción de la enzima** Para la extracción de la enzima se siguió el procedimiento descrito por Mahoney y Fenton (13, 22). Células frescas de un cultivo fueron centrifugadas a 20,000 rpm por 20 minutos en una centrifuga refrigerada MIKRO RAPID a 4°C. Las células lavadas fueron tratadas con 1 a 3% de tolueno

(Sigma) (v/v) bajo agitación por 90 minutos a 30°C. La extracción de la enzima se realizó en tampón fosfato de potasio a concentraciones de 0.001 M a 1 M, a pH 6.0-8.0. suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso (tampón suplementado). El tiempo de extracción fue de 15 a 20 horas, a temperaturas de 22 a 37°C.

**Purificación parcial de la enzima.** Se trabajó con un cultivo fresco, las células fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células fueron tratadas con 2% de tolueno (v/v) por 90 minutos bajo agitación (13, 22), se adicionó el tampón suplementado y se mantuvo por 15 horas a 30°C. Se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recolectó el sobrenadante con una actividad de 156 U<sub>LACTOSA</sub> ml<sup>-1</sup>, se adicionó un volumen de acetona a 4°C. La acetona residual fue evaporada en un flujo de aire y el precipitado fue redissuelto en un volumen de tampón suplementado y ditioeritritol 1mM como estabilizador.

**Propiedades de la enzima soluble.** El pH óptimo y temperatura para la actividad de la enzima se determinó en un rango de pH de 5.8 - 8.0 a 40°C y para la temperatura un rango de 25 a 55°C, usando lactosa 58 mM preparada en tampón suplementado 0.1 M. Los valores de Km y Vm para concentraciones de lactosa entre 5 - 100 mM para la enzima fueron determinados por el método de Lineweaver-Burk.

Para la constante de inhibición Ki se utilizaron las mismas concentraciones utilizadas para la determinación de Vm y Km adicionándole a cada concentración galactosa 28 mM.

La termoestabilidad de la enzima se determinó entre 25 y 55°C. Las muestras fueron mantenidas por 15 minutos a las temperaturas indicadas en tampón suplementado 0.1M y luego colocadas en un baño de hielo.

#### **Determinación de la actividad enzimática.**

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D MILTON ROY, siguiendo el procedimiento descrito por Mahoney y col. (27), utilizando como sustrato 1.25 mM de O-Nitrofenil β-D-galactopiranosido (ONPG) en tampón suplementado 0.1 M, pH 6.6. Tampón que se utilizará en todas las determinaciones de actividad enzimática. La mezcla de reacción contenía 2 ml de ONPG y 0.1 ml del

extracto enzimático (dilución apropiada), luego se incubó a 40°C durante 2 minutos, la reacción fue detenida con 0.9 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 M y se leyó a 420 nm comparándose los resultados con una curva estándar de O-Nitrofenol (Sigma).

La actividad de la enzima también fue determinada con lactosa (Sigma), a concentraciones de 58 mM en tampón suplementado 0.1 M. La mezcla de reacción contenía 2 ml de la solución de lactosa y 0.1 ml de la enzima.

La glucosa liberada fue determinada por el método de la glucosa oxidasa (Sigma). La unidad de actividad de β-galactosidasa es definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de O-Nitrofenol o glucosa por minuto por miligramo de proteína.

**Análisis.** El peso seco de las levaduras fue determinado gravimétricamente para lo cual se extrajeron muestras del cultivo de 5 ml las cuales fueron centrifugadas a 10,000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C y lavadas dos veces con agua destilada y transferidas a placas petri de 10X75 mm previamente pesadas, dejadas secar toda la noche en la estufa a 100°C MEMMERT S 30 y pesados en una balanza analítica SARTORIUS.

La lactosa se determinó de acuerdo al método de Miller (27) empleando el ácido 3,5 Dinitrosalicílico (Sigma).

La proteína fue determinada por el método de Lowry (21) empleando el reactivo Folin-Ciocalteu y seroalbúmina de bovino 0.1 mg/ml (Sigma) como estándar.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Selección de las cepas de levaduras con potencial de producción de β-galactosidasa.**

Los resultados de la actividad específica y de unidades de actividad por miligramo de peso seco de las levaduras productoras de β-galactosidasa en lactosa y ONPG como sustratos son mostrados en la tabla 1. La levadura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, maximiza la respuesta, en relación a la actividad específica y a las unidades de actividad por miligramo de peso seco. Siendo estos valores de 14.5 U/mg de proteína y de 3.5 Unidades de actividad por mg de peso seco para lactosa y de 5.43 U/mg de proteína y de 1.31 Unidades de actividad/mg de peso seco para ONPG, en contraste con los valores obtenidos por Mahoney y Wtaker (22) de 8.39 U/mg proteína y 3.29 U.A/mg peso seco y 3.11 U/mg proteína y 1.22

Tabla 1. Selección de cepas productoras de  $\beta$ -Galactosidasa en medio M-I

Cepas	Actividad Enzimática sobre ONPG como sustrato			Actividad Enzimática sobre Lactosa como sustrato		
	Proteína mg/ml	Actividad Específica U/mg proteína	Unidades De Actividad/mg peso seco	Proteína mg/l	Actividad Específica U/mg proteína	Unidades de Actividad/mg peso seco
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1109	2.15	14.50	3.50	2.15	5.43	1.31
<i>Kluyverpmces marxianus</i> NRRL-Y-1151	1.91	13.58	2.92	1.91	5.07	1.09
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1196	1.99	12.8	3.23	1.99	4.80	1.22
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1175	1.91	12.2	2.53	1.91	4.53	0.94
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1207	1.97	12.02	3.05	1.97	4.44	1.13
<i>Candida pseudotropicalis</i> NRRL-Y- 329	1.84	11.00	2.68	1.84	4.05	0.99

U.A/mg peso seco para lactosa y ONPG respectivamente.

**Optimización del medio de cultivo para la producción de  $\beta$ -galactosidasa de *K. marxianus*.** El análisis estadístico del diseño factorial simplificado se muestran en la **tabla 2**, en base a solo 15 experimentos, tuvo como objetivo encontrar las variables que maximizen tanto la actividad específica, como las unidades de actividad por miligramo de peso seco. El modelo que permite encontrar las variables (factores) que influyen significativamente en el diseño factorial con una confiabilidad del 95% fue el de paso a paso (9, 17). Los factores obtenidos fueron factor B [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], factor C (extracto de levadura) y factor D ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y la interacción de ellos. El factor A (lactosa) no influye significativamente en el diseño factorial empleado, sin embargo con las concentraciones usadas y la interacción de los otros factores maximizan las respuestas de actividad específica y unidades por miligramo de peso seco para las variables significativas en el nivel 2 del diseño.

Los valores que permitieron obtener las mejores respuestas en el nivel 2 corresponden en g/l: lactosa 50.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.5, extracto de levadura 5.0 y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.5. Con estos valores se obtuvieron 1330 unidades de ONPG por gramo de biomasa. Valores entre 1049 a 4000 unidades de ONPG de actividad por gramo de biomasa fueron obtenidos en medios conteniendo entre 45 y 150 g/l de lactosa (5, 14, 19, 22). A un nivel de 75 g/l de lactosa no se obtuvo un mayor rendimiento de unidades de actividad de

la enzima esto podría ser debido a las características fermentativas de *Kluyveromyces marxianus* y a la interacción de los otros factores. Esta levadura tiene un efecto «crabtree» negativa, en la cual etanol es producido bajo condiciones de oxígeno limitante. Los cultivos en matraces agitados se consideran limitados de oxígeno y por esta razón exhiben una larga fase de crecimiento restrictivo asociado a la producción de etanol (20, 26).

Con un nivel de 25 g/l se obtuvieron menores rendimientos, esto podría deberse a que la concentración de lactosa presente en el medio y la interacción de los otros factores no permitieron una adecuada síntesis de la enzima (10, 12)

**Extracción de la enzima.-** Los resultados se muestran en la **tabla 3**. Las condiciones óptimas fueron obtenidos cuando se empleó 2% de tolueno (v/v), tampón fosfato de potasio suplementado 0.1 M, pH  $7.0 \pm 0.1$ , 30°C y 15 horas de extracción. Tiempos de 17 y 21 horas bajo condiciones similares han sido reportados para *Kluyveromyces. marxianus*. (13, 22).

El resultado de la purificación parcial de la enzima se muestra en la **tabla 4**. La purificación parcial con acetona permitió obtener una actividad específica de  $73 \text{ U}_{\text{LACTOSA/mg}}$  de proteína y un rendimiento de purificación de 93.3%. Valores de 89 y 97% son reportados (16, 23).

**Propiedades de la enzima.** El perfil de temperatura se determinó entre 25 y 55°C a pH 6.6. La temperatura óptima fue de 40°C (**Figura 1**). El perfil de pH se determinó en un rango de 5.8 y

Tabla 2. Respuesta factorial de la optimización del medio de cultivo químicamente formulado para la producción de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de laboratorio.

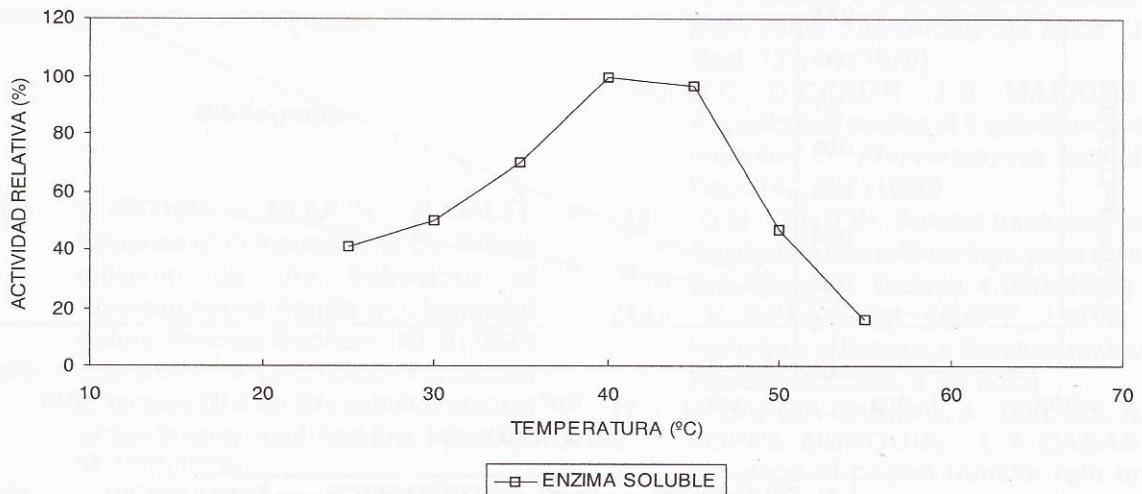
N° de Experimento	Factores				Concentración celular (g/l)	Rendimiento Y x/s	Proteína (mg/ml)	Respuesta Actividad Específica U/mg proteína	Respuesta Unidades Actividad ONPG/ mg. Peso seco celular	Unidades de Actividad ONPG/l
	A (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> g/l	B E. Levadura g/l	C K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> g/l	D g/l						
1	25	5.0	2.5	3.0	8.06	0.306	2.07	4.08	1.045	8,423
2	50	5.0	2.5	4.5	8.17	0.160	2.10	4.08	1.045	8,538
3	25	7.5	5.0	4.5	8.53	0.322	2.00	4.59	1.070	9,127
4	50	7.5	2.5	3.0	8.09	0.158	2.00	5.28	1.300	10,517
5	25	5.0	5.0	4.5	7.71	0.289	2.18	4.50	1.275	9,830
6	50	7.5	5.0	3.0	8.35	0.158	2.51	4.37	1.310	10,939
7	25	5.0	2.5	4.5	7.90	0.297	2.22	4.67	1.320	10,428
8	50	7.5	5.0	4.5	8.92	0.170	2.17	5.45	1.330	11,864
9	75	7.5	5.0	4.5	7.97	0.101	2.10	4.48	1.175	9,365
10	50	10.0	7.5	6.0	8.32	0.156	2.25	4.56	1.320	10,982
11	75	10.0	5.0	4.5	8.28	0.104	2.11	4.97	1.265	10,474
12	50	7.5	7.5	6.0	8.88	0.168	2.14	5.27	1.265	11,233
13	75	10.0	7.5	4.5	8.35	0.104	2.12	5.25	1.330	11,106
14	50	7.5	5.0	6.0	8.24	0.155	2.52	4.34	1.310	10,794
15	75	10.0	7.5	6.0	8.24	0.104	2.27	4.42	1.220	10,053

**Tabla 3.** Condiciones óptimas para la extracción de  $\beta$ -Galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 1109.

Factores	Promedio		Intervalo de confianza 99%	
	Actividad específica U/mg proteína	Unidades de Actividad <sub>ONPG</sub> /mg peso seco	Actividad específica U/mg proteína	Unidades de Actividad <sub>ONPG</sub> /mg peso seco
<b>Concentración de tolueno (%)</b>				
1	3.37	0.84	3.31 - 3.43	0.83 - 0.86
2	4.07	1.19	4.01 - 4.13	1.18 - 1.20
3	2.87	0.91	2.81 - 2.92	0.90 - 0.92
<b>Tiempo de Extracción (h)</b>				
15	3.62	1.00	3.56 - 3.68	0.99 - 1.01
17	3.39	0.98	3.33 - 3.45	0.97 - 0.99
20	3.31	0.97	3.25 - 3.37	0.96 - 0.98
<b>Temperatura (°C)</b>				
22	3.43	1.00	3.32 - 3.55	0.99 - 1.03
30	3.85	1.16	3.73 - 3.97	1.13 - 1.18
37	3.57	1.10	3.45 - 3.69	1.07 - 1.12
<b>pH</b>				
6.6	3.61	1.05	3.48 - 3.72	1.03 - 1.07
7.0	3.85	1.16	3.73 - 3.97	1.14 - 1.19
7.4	3.40	1.05	3.28 - 3.51	1.03 - 1.07
<b>Tampón fosfato de potasio (M)</b>				
0.001	3.54	0.97	3.42 - 3.66	0.94 - 0.99
0.1	3.93	1.20	3.81 - 4.05	1.18 - 1.23
1	3.38	1.09	3.26 - 3.50	1.07 - 1.12

**Tabla 4.** Purificación parcial de la enzima

Procedencia	Volumen (ml)	Actividad U/ml	Proteína (mg/ml)	A. Específica U/mg proteína	Unidades totales	Rendimiento (%)
Extracto crudo	300	155.63	5.36	29.02	46,689	100
Precipitación con acetona	10	4330	59.4	72.90	43,300	93.3



**Figura 1.** Perfil de temperatura

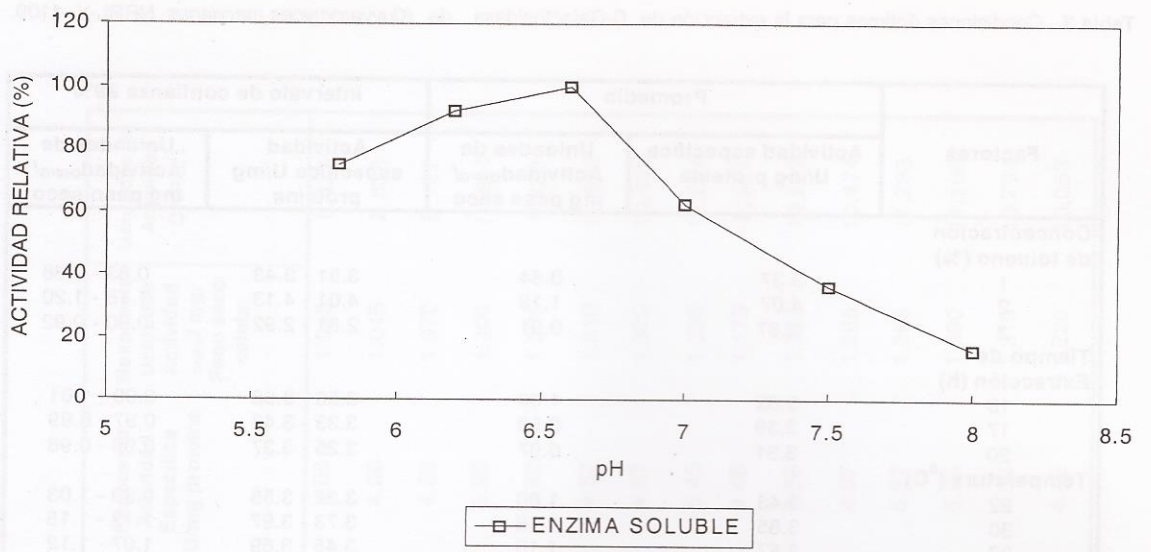


Figura 2. Perfil de pH

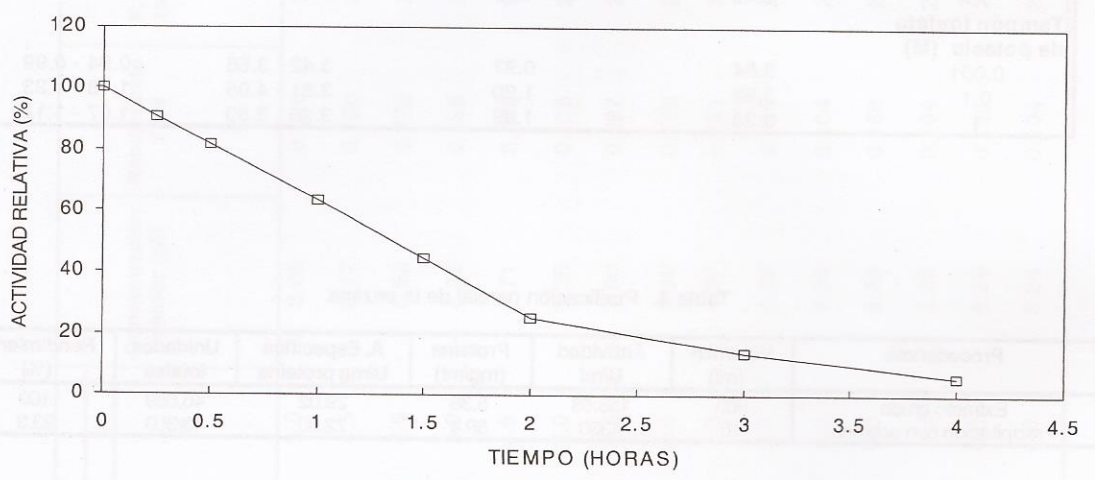


Figura 3. Estabilidad de la enzima

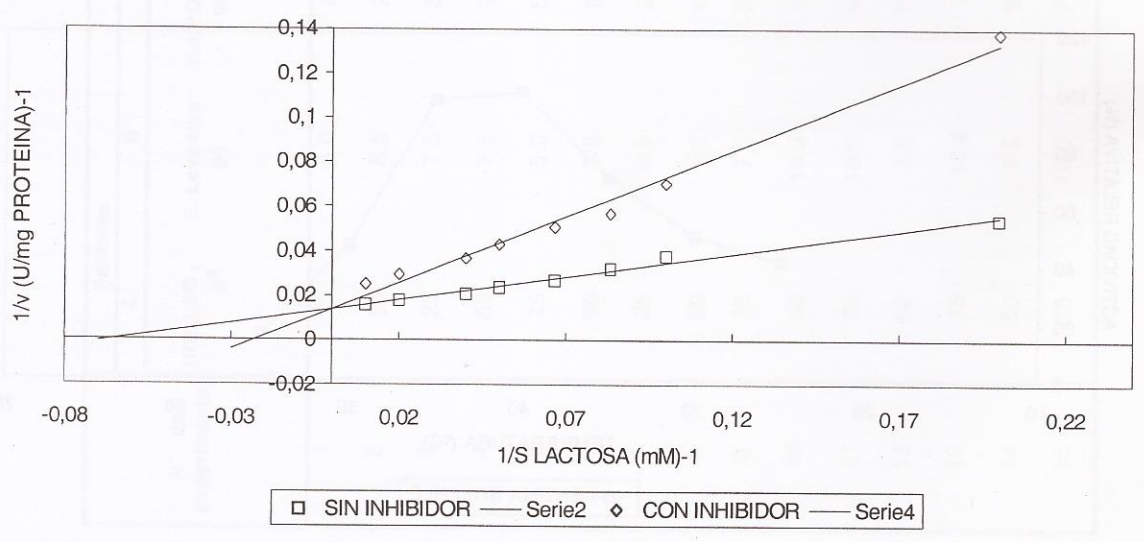


Figura 4. Constantes cinéticas Km, Vm, Ki

8.0, utilizando tampón suplementado 0.1M. La máxima actividad se obtuvo a pH 6.6. (**figura 2**) Los resultados de la estabilidad de la enzima a la temperatura se muestran en la **figura 3**. La mayor actividad relativa se obtuvo a 25 °C, reteniendo 88% de la actividad original a 40 °C y un 3.3% a 55 °C. La vida media de la enzima fue de 56 minutos. Una hora de vida media es reportado (19).

Usando lactosa como sustrato a varias concentraciones se obtuvo un valor de  $K_m$  de 15 mM y una  $V_m$  de  $7.3 \times 10^{-5}$  M/min. La constante de inhibición fue de 15 mM. (**figura 4**) Los valores obtenidos son similares a los reportados (3,4,11,19).

## CONCLUSIONES

La cepa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 demostró ser la mejor productora de  $\beta$ -galactosidasa sobre medio M-I. Los mejores rendimientos de la enzima se obtuvieron con lactosa 5%, extracto de levadura 5%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.75% y  $K_2HPO_4$  0.45%. Las óptimas condiciones establecidas para la extracción de la enzima incluyeron 2% de tolueno (v/v), pH 7.0  $\pm$  0.1, 15 horas de tratamiento, a 30 °C en tampón suplementado 0.1 M. Se obtuvo 93.3% de rendimiento en la purificación de la enzima con acetona.

*Agradecimiento:* El presente trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú CONCYTEC, convenio No.6868-09-94-OAI. El agradecimiento a la Magister Fátima Medina de la Facultad de Matemáticas de la UNMSM por el análisis estadístico del presente trabajo.

## Bibliografía

- (1) P. ANTIER, G. MOULIN, P. GALZY. Influence of composition of the culture medium on the behaviour of *Kluyveromyces fragilis* in Chemostat culture. *Process Biochem.*, **29**, 9 (1990)
- (2) S. BALES, F.J. CASTILLO. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl. And Env. Microbiol.* **37**,1201(1979)
- (3) L. BIERMANN and M.D.GLANTZ. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochem. Biophys, Acta* **167**, 373 (1968)
- (4) G.B. BORGLUM, M.Z. STERNBERG. Properties of a fungal lactase. *J. Food Sci.* **37**, 619 (1971)
- (5) L.T. CASAS. Contribución al desarrollo de un proceso para la obtención de un biocatalizador con actividad de  $\beta$ -galactosidasa que pueda ser aplicado en leche y suero dulce de leche. Tesis de Doctor en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 178 pp (1992)
- (6) F.J. CASTILLO, E. SANCHEZ. Studies of the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. *Acta Científica Venezolana* **29**, 113 (1978)
- (7) F.J. CASTILLO, E. SANCHEZ, J.A. GONCALVEZ. Nitrogen supplementation of milk whey for the growth of *Kluyveromyces fragilis*. *Acta Científica Venezolana* **30**, 588 (1979)
- (8) K-CH. CHEN, J-Y. HOUNG, T-CH. LEE. Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. *Enz. Microbiol. Technol.* **14**, 659 (1992)
- (9) D. R. COX, E.J. SNELL. The choice of variables in observational studies, *Appl. Statist* **23**, 51(1974)
- (10) R. DAVIES. Some factors affecting lactase formation and activity in *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 425 (1956)
- (11) R.C. DICKSON, I.R. DICKSON, J.S. MARKINS. Purification and properties of an inducible  $\beta$ -galactosidase isolated from yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bact.* **137**, 51 (1979)
- (12) R.C. DICKSON, J.S. MARKINS. Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lacti*. *J. Bact.* **142**, 777 (1980)
- (13) D.M. FENTON. Solvent treatment for  $\beta$ -galactosidase release from yeast cells. *Enz. Microbiol. Technol.* **4**, 229 (1982)
- (14) V. GEKAS, M. LOPEZ LEIVA. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* **2**, 2 (1985)
- (15) M. GARCIA-GARIBAY, J. TORRES, A. LOPEZ MUNGUÍA, L.T. CASAS. Influence of oxygen transfer rate on  $\beta$ -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Letters*, **9**, 417 (1987)



- (16) C. GREENBERG, R.R. MAHONEY. A rapid purification of  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus niger*) from a commercial preparation. *J. Food Sci.* **46**, 684 (1981)
- (17) R.R. HOCKING. The analysis and selection of variables in linear regression. *Biometrics* **32**, 1 (1976)
- (18) V.H. HOLSINGER. Applications of lactose-modified milk and whey. *Food Technol.* **32**, 38 (1978)
- (19) A. ILLANES, M.E. ZUÑIGA, A. RUIZ. Análisis comparativo de dos lactasas microbianas inmovilizadas. *Alimentos N°* **1**, 26 (1993)
- (20) V.A. INCHAURRONDO, O.M. YANTORNO, G.E. VOGET. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochem.* **29**, 47 (1994)
- (21) O.B. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- (22) R. MAHONEY, A. NICKERSON, J.R. WHITAKER. Selection of strains growth condition and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **58**, 1620 (1975)
- (23) R. MAHONEY, J.R. WHITAKER. Purification and physicochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* **43**, 584 (1978)
- (24) B.L. MAIORELLA, F.J. CASTILLO. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. *Process Biochem.* **19**, 157 (1984)
- (25) A.J. MAWSON. Yeast biomass production from acid whey permeate. *Biotechnol. Letters* **10**, 503 (1988)
- (26) A. MICHEL, F. JACOB, J. PERRIER, S.E. PONCET. Yeast production from crude sweet whey. *Biotechnol.* **30**, 780 (1987)
- (27) G.L. MILLER. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959)
- (28) D.M. PAIGE, E. LEONARDO, A. CORDANO, J. NAKASHIMA, B. ADRIAZEN, G.G. GRAHAM. Lactose intolerance in Peruvian children effect of age and early nutrition. *Am. J. Nutr.* **25**, 297 (1972)
- (29) S. SANCHEZ, F.J. CASTILLO. Producción, extracción y caracterización parcial de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. *Acta Científica Venezolana* **31**, 154 (1980)
- (30) L.H. SEGEL. *Enzyme Kinetics*. A Willey Interscience Publication. New York, pp 1-17, (1975)
- (31) W.L. WENDORFF, C.H. AMUNDSON, N.F. OLSON. Use of yeast  $\beta$ -galactosidase in milk products. *J. Milk Food Technol.* **34**, 294 (1971)
- (32) L.E. WIERZBICKI, F.V. KOSIKOWSKI. Lactase potential of various microorganisms grown in whey. *J. Dairy Sci.* **56**, 26 (1973)